Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. D. Plester

Untersuchungen zur Aufnahme verschiedener Glucosearten von der Nasenschleimhaut des Kaninchens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Werner de Marées
aus Chemnitz/Sachsen

1970

Aus der Hals-Nasen-Ohren-Klinik der Universität Tübingen
Direktor: Professor Dr. med. D. Plester

Untersuchungen zur Aufnahme verschiedener Glucosearten von der Nasenschleimhaut des Kaninchens

Inaugural-Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der Medizin

dem Fachbereich Klinische Medizin
der Eberhard-Karls-Universität
zu Tübingen

vorgelegt von
Werner de Marées
aus Chemnitz/Sachsen

1970

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

Dekan: Professor Dr. J. Hirschmann

1. Berichterstatter: Professor Dr. H. Breuninger

2. Berichterstatter: Professor Dr. D. Plester

FOTODRUCK PRÄZIS Barbara v. Spangenberg KG • Tübingen

Inhaltsverzeichnis

1. EINLEITUNG

1.1. Quantitative Meßmethoden zur Ermittlung des Resorptionsvermögens der menschlichen Nasenschleimhaut mit radioaktiven Isotopen

1.2. Problemstellung

2. PHYSIOLOGISCHE VORBEMERKUNGEN

3. METHODIK

3.1. Versuchsanordnung

3.2. Charakteristika der verwendeten Glucoseverbindungen

3.3. Methode der Flüssigkeitszintillationszählung

3.4. Statistische Auswertung

3.5. Anhang: Versuche an menschlichen überlebenden Schleimhautstücken

4. ERGEBNISSE

4.1. Blutkonzentrationsmessungen nach intravenöser und nasaler Applikation von

4.1.1. markierter Glucose
4.1.2. markierter 2-Desoxyglucose
4.1.3. markierter 3-Oxy-Methylglucose

4.2. Anhang: Glucosekonzentrationsmessungen an menschlichen überlebenden Schleimhautstücken

5. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

6. LITERATURVERZEICHNIS

1. EINLEITUNG

1.1. Quantitative Meßmethoden zur Ermittlung des Resorptionsvermögens der menschlichen Nasenschleimhaut mit radioaktiven Isotopen

Die Fähigkeit der Nasenschleimhaut, Stoffe verschiedenster Art aufzunehmen, wurde schon durch zahlreiche Untersuchungen am Menschen und im Tierversuch geprüft. Die Methoden, die in den Dissertationen von BERL und BUSCH bereits ausführlich dargestellt sind, konnten in den letzten Jahren besonders durch die Anwendung von radioaktiven Isotopen ergänzt und erweitert werden (TOGANOW, BREUNINGER). Dadurch wurde vor allem ermöglicht, quantitative Ergebnisse über das Aufnahmevermögen der Nasenschleimhaut zu erhalten.

Die Messungen zur Bestimmung des Resorptionsvermögens mit radioaktiven Isotopen können dabei direkt an der Nasenschleimhaut erfolgen. Diese Methode, die bevorzugt von NAUMANN und MÜNZEL angewendet wurde, ist seit einiger Zeit besonders in der Dermatologie bekannt (KUTZIM und WISKEMANN). Dabei wird die Abnahme der Aktivität am Auftragungsort (Schleimhaut, Haut) in einer bestimmten Zeit registriert und als Maß für die Resorptionskapazität betrachtet. Zur Anwendung kommen γ-Strahlen emittierende radioaktive Nuklide.

Bei der zweiten Methode erfolgt die Messung nach dem Übertritt der auf die Nasenschleimhaut aufgetragenen radioaktiven Substanz ins Blut durch Ermittlung des Aktivitätsanstieges

im Blut. Die in einer bestimmten Zeit im Blut nachweisbare Menge des radioaktiven Nuklides läßt sich als Maß für das Resorptionsvermögen ansehen. HANSEN und NAUMANN führten mit diesem Verfahren Messungen mit radioaktiv markierten Stoffen von unterschiedlichem Molekulargewicht durch. Der Teil des Resorptionsvorganges, der vor der Aufnahme ins Blut liegt, wird hierbei jedoch nicht getrennt berücksichtigt.

Ein dritter Weg, die Resorptionsfähigkeit der Nasenschleimhaut zu prüfen, ist die Kombination der Direktmessung mit der Aktivitätsmessung im Blut. Bei diesem Verfahren wird die Aufnahme der radioaktiven Substanz in die Nasenschleimhaut durch den Aktivitätsabfall nach dem lokalen Aufbringen und die danach im Blut auftretende Menge der Substanz über den Aktivitätsanstieg in einer bestimmten Zeit gemessen. Auch hierbei werden die Vorgänge in der Schleimhaut selbst nicht erfaßt. Mit dieser Methode führten NAUMANN und MÜNZEL Untersuchungen mit ^{131}J und ^{131}J-markiertem Human-Albumin durch. Freies Jod wurde dabei um den Faktor 1oo besser resorbiert als an Human-Albumin gebundenes Jod.

Eine letzte Methode ist die Exhalationsmessung. Sie wurde vor allem von BREUNINGER und Mitarbeitern zu Untersuchungen über die Aufnahme von markierter Glucose in verschiedene Schleimhautabschnitte (Nase, Mund, Ohr) eingesetzt. Dabei wird die $^{14}CO_2$-Konzentration in der Ausatmungsluft gemessen, also nur ein Stoffwechselprodukt der auf die jeweilige Schleimhaut aufgebrachten radioaktiven Glucose erfaßt.

Die in den beschriebenen Untersuchungen verwendeteten markierten Substanzen werden nach der Applikation auf die Nasenschleimhaut und ihrem Übertritt ins Blut vom Organismus in unterschiedlicher Weise beeinflußt. Bei der Exhalationsmessung wird nur das Stoffwechselprodukt $^{14}CO_2$ erfaßt, bei der kombinierten Methode das zur Untersuchung gekommene ^{131}J verstärkt in der Schilddrüse gespeichert, kann also auch nur zum Teil später im Blut nachgewiesen werden.

1.2. Problemstellung

In der vorliegenden Arbeit wird nun der Versuch unternommen, mit der bereits bekannten Methode der Blutkonzentrationsmessung (Flüssigkeitszintillationszählung) durch Anwendung von radioaktiv markierten Glucoseverbindungen, von denen bekannt ist, daß sie kaum oder nicht vom Körper abgebaut werden, einen tieferen Einblick in das Stoffwechselgeschehen bei der nasalen Glucoseaufnahme zu erhalten.

Da die verwendeten Aktivitäten relativ hoch waren (1 µCi/kg Körpergewicht), wurden Tierversuche (Kaninchen) durchgeführt.

Um die unterschiedlichen Ergebnisse an normaler und pathologisch veränderter Schleimhaut bei den früheren Exhalationsversuchen zu überprüfen, wurden außerdem Untersuchungen über die Glucoseaufnahme an überlebenden Nasenschleimhautstücken vom Menschen durchgeführt.

2. PHYSIOLOGISCHE VORBEMERKUNGEN

Das Geruchsorgan des Kaninchens

Die Nasenhöhle der Säugetiere ist wie beim Menschen paarig angelegt. Die rechte und linke Hälfte werden ebenfalls durch ein knorpliges Nasenseptum voneinander getrennt. Jede Nasenhöhle erstreckt sich vom äußeren Nasenloch bis zur Choane, dem Übergang der Nasenhöhle in die obere Pharynxetage. Sie wird in das Vestibulum (Nasenvorhof), die regio respiratoria (vordere Muschelregion) und die regio olfactoria (Riechorgan) unterteilt. (KRAUSE, JAFFE u.a.)

Histologisch besteht die Nasenschleimhaut aus respiratorischem Epithel, einem zweireihigen Zylinder-Flimmer-Epithel. Dieses senkt sich auch in den Canalis incisivus ein, einer Verbindung zwischen Nasen- und Mundhöhle. Vom äußeren Nasenloch aus setzt sich das geschichtete Plattenepithel der Epidermis in die Nasenhöhle fort und reicht beiderseits bis zur vorderen Muschel.

Die bindegewebige Lamina propria der Nasenschleimhaut ist von kavernösen Venengeflechten durchsetzt und enthält im Bereich des Septums und Masupiums - eines Schleimhautwulstes vor dem Sinus maxillaris - tubuläre Drüsen. Im Bereich des knöchernen Anteils des Vomer findet sich eine drüsige Vorwölbung, das Jacobson'sche Organ. Es trägt an der medialen Wand Riechepithel und an der lateralen Wand respiratorisches Epithel. Beide Epithelarten gehen nach dorsal und ventral zu ineinander über. Das Jacobson'sche Organ findet sich nach LIVERIERO und BELFORTE bei allen Säugetieren im Fetalleben und atrophiert bei den mikrosmatischen Individuen während

der ontogenetischen Entwicklung.

Das Riechepithel der regio olfactoria erscheint zuerst etwas vor der Nasenhöhlenmitte und breitet sich auf das Masupium und Nasenseptum in einem ca. 3 mm hohen Streifen aus. Auch die freien Enden der mittleren und hinteren Muschel sind mit diesem Epithel überzogen. Das Riechepithel besteht aus Riech- und Stützzellen. Die Riechzellen stellen lange, fadenartige Gebilde dar, deren distaler Fortsatz kurze, starre Riechhärchen trägt und deren proximaler Fortsatz in eine Riechnervenfaser übergeht. Zwischen den Riechzellen liegen die Stützzellen, darunter befindet sich die Basalzellschicht.

Im Bereich des Riechepithels trifft man seröse Bowmann'sche Drüsen an, die aus verzweigten, alveolären Einzeldrüsen zusammengesetzt und nach MIRA typische Schleimdrüsen sind. Das Sekret dieser Drüsen dient zur Befeuchtung der Riechschleimhaut. Die Schleimhaut der lateralen Wand der Nasenhöhle enthält ebenfalls seröse Drüsen, dagegen ist die Schleimhaut der Choanen frei von Drüsen und wird von respiratorischem Epithel ausgekleidet, in welches Becherzellen eingelagert sind.

Zur Gefäßversorgung der Nasenschleimhaut beim Kaninchen dienen nach NAUMANN drei arterielle Kapillarnetze: ein tiefes, periostales, ein um die Drüsen liegendes, periglanduläres und ein oberflächliches, superficielles. Die diese Kapillarnetze speisenden Arterien liegen in der Tiefe der Schleimhaut. Der venöse Abfluß geht über ein oberflächliches und ein tiefliegendes Venensystem. Im Gegensatz zu den Arterien können auch größere Venen der

Schleimhautoberfläche genähert liegen.

Das eigentliche Schwellgewebe (Schwellkörper) findet sich nur an umschriebenen Stellen, während Venenplexus überall angetroffen werden können.

Die Aufgaben der Nasenschleimhaut entsprechen qualitativ denen beim Menschen. Die eingeatmete Luft wird durch die gute Vaskularisation der Schleimhaut erwärmt, durch die Schleimdrüsentätigkeit angefeuchtet und den choanenwärts gerichteten Sekret- und Flimmerstrom des Epithels von Staubteilchen befreit.

3. METHODIK

3.1. Versuchsanordnung

Es wurden drei Versuchsreihen durchgeführt, die erste mit uniform markierter ^{14}C D-Glucose (in den weiteren Ausführungen als Glucose bezeichnet) mit einer spezifischen Aktivität von 3,7 mCi/mM, die zweite mit C-1-markierter 2-Desoxy-D-Glucose (2-Desoxyglucose) mit einer spezifischen Aktivität von 1,97 mCi/mM und die dritte mit CH_3-markierter 3-Oxy-Methyl-D-Glucose (3-Oxy-Methylglucose) mit einer spezifischen Aktivität von 1o mCi/mM.

Dabei ging man wie folgt vor: 6 Kaninchen von Kreuzrassen mit einem mittleren Gewicht von 3,44 kg, bei der zweiten Serie 1o Kaninchen von durchschnittlich 3,53 kg und bei der letzten Serie wiederum 6 Kaninchen mit einem mittleren Gewicht von 4,o1 kg, die alle annähernd gleich alt waren, wurden mit einer Magensonde narkotisiert (Äthylurethan, 2o%-ig, 7,5 ml/kg). Um später eine zentrale Blutentnahme zu ermöglichen, wurde nach Erreichen der Narkosetiefe (nach ca. 3o - 45 Minuten) bei jedem Tier die rechte Vena jugularis freipräpariert und anschließend ein Herzkatheter eingeführt.

Von dem leicht zu tastenden unteren Ende des Kehlkopfes ausgehend, wird dabei zunächst in der Medianlinie des Halses ein etwa 3 - 5 cm langer Hautschnitt angelegt und die Halsfascie durchtrennt. Nach Auseinanderziehen und Anklemmen der Wundränder auf der rechten Seite ist nun die oberflächlich liegende Vena jugularis am medialen Rand des Musculus sternocleidomastoideus gut sichtbar. Diese wird auf einer

ca. 2 cm langen Strecke aus dem umgebenden Bindegewebe gelöst, an beiden Enden jeweils mit einem Faden umschlungen und cranialwärts unterbunden. Caudal legt man nur eine lockere Schlinge und schlitzt dazwischen die Gefäßwand unter leichtem Anziehen des Fadens. Anschließend wird ein dünner Ureterenkatheter (Größe 2-3) bis in den rechten Herzvorhof vorgeschoben und mit Hilfe des unteren Fadens befestigt. Um die Blutentnahme zu erleichtern, schließt man an den Katheter noch ein Perfusionsbesteck mit Membranverschluß und einem Durchmesser von o,7 mm der Firma Braun, Melsungen an und füllt beide bei Versuchsbeginn mit ca. o,5 ml einer heparinisierten physiologischen NaCl-Lösung (auf 2o ml NaCl-Lösung 5 ml Liquemin der Firma Roche, Granzach; 1 ml Liquemin enthält 5000 IE Heparin) auf, um ein Verstopfen durch geronnenes Blut zu verhindern.

Anschließend erfolgte bei der Hälfte der Tiere jeder Versuchsreihe, die unter Beachtung der statistischen Zufälligkeit aus der jeweiligen Gruppe ausgewählt wurden, die Injektion von D-Glucose, 2-Desoxyglucose und 3-Oxy-Methylglucose mit Tuberkulin-Einmalspritzen der Firma Braun, Melsungen in die linke Ohrvene. Gegeben wurde 1 µCi/kg Körpergewicht in o,1 ml. Glucose und 2-Desoxyglucose waren in destilliertem Wasser, 2-Oxy-Methylglucose in 75%-igem Äthylalkohol gelöst. 3,9,18,27,3o und 36 Minuten nach der jeweiligen Applikation wurde 1 ml Blut aus dem Herzkatheter entnommen.

An den restlichen Kaninchen der drei Versuchsserien wurden wiederum 1 µCi/kg Gewicht markierte Glucose, 2-Desoxyglucose und 3-Oxy-Methylglucose mit einer geeichten Pipette auf die

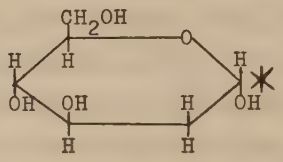
Nasenschleimhaut beider Nasenhöhlen aufgeträufelt. Bei diesen Tieren erfolgte ebenfalls nach 3, 9, 18, 27, 30 und 36 Minuten die zentrale Entnahme von 1 ml Venenblut.

3.2. Charakteristika der verwendeten Glucoseverbindungen

Bei den Säugetieren (Kaninchen) gibt es wie beim Menschen zwei Möglichkeiten, Glucose im intermediären Stoffwechsel abzubauen. Der am häufigsten gebrauchte Weg wird als direkt oxydativer Abbau oder Pentose-Phosphat-Zyklus nach DICKENS-HORECKER, der zweite als glykolytischer Abbau nach EMDEN-MEYERHOF bezeichnet. Die Endprodukte beider Abbauwege sind H_2O und CO_2. Die dabei gewonnene Energie steht dem Körper zu vielen spezifischen Aufgaben zur Verfügung. Sie wird hauptsächlich in Form von ATP (Adenosintriphosphorsäure) gespeichert.

Beim Kaninchen ist unter normalen Bedingungen die Kohlehydratumwandlung in Fett gering und der Glykogengehalt der Leber großen jahreszeitlichen Schwankungen unterworfen (JAFFE). Dieser unterschiedliche Glykogengehalt mit und ohne Hyperglykämie hat beim Kaninchen jedoch keine Bedeutung, da verhältnismäßig selten ein spontaner Diabetes beobachtet wird. Der normale Blutzuckerwert schwankt stark. Er liegt durchschnittlich bei o,1% und hat keine Beziehung zur jeweiligen Körpergröße (v. BUDDENBROCK).

Die 2-Desoxyglucose gehört zu den Desoxyzuckern, bei denen eine OH-Gruppe durch ein H-Atom ersetzt ist. Diese Umwandlung führt z.B. an der primären Alkoholgruppe des C-Atom 6 zu einem in der Natur weit verbreiteten Desoxyzucker, der 6-Desoxyglucose. Die hier benutzte 2-Desoxyglucose ist in einem pflanzlichen Glycosid gefunden worden und hat folgende Formel:



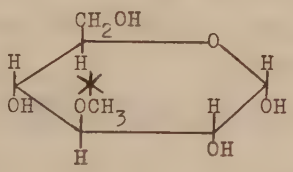
✱markiertes C-Atom

Die Desoxyzucker sind besonders in ihrem Verhalten gegenüber den enzymatischen Eigenschaften der Zelle von Interesse. So wird 2-Desoxyglucose in geringem Maße von Glucoseoxydase umgesetzt (25, wenn die Substratspezifität der Glucose 1oo beträgt), dagegen reagiert sie mit Galactoseoxydase nicht. Glucose-6-Phosphat-Dehydrogenase oxydiert 2-Desoxyglucose-6-Phosphat kaum im Gegensatz zum Glucose-6-Phosphat (o,36, wenn Glucose-6-Phosphat 1oo gesetzt wird). Des weiteren wurde bei Untersuchungen am isolierten Zwerchfell der Ratte festgestellt, daß 2-Desoxyglucose von Hexokinase phosphoriliert als 2-Desoxyglucose-6-Phosphat liegenbleibt und dadurch die Glycolyse und den Pentosephosphatzyklus blockiert (BARTELHEIMER u.a.). Im Gegensatz zur Glucose geht also die 2-Desoxyglucose nicht in die Glycolyse ein, d.h. sie wird nicht verstoffwechselt.

Die Ausscheidung über die Niere erfolgt wie bei der Glucose, jedoch findet im proximalen Tubulus keine Rückresorption statt(KUNZ).

Auch bei der von uns in der dritten Versuchsreihe benutzten 3-Oxy-Methylglucose wird angenommen, daß ein glycolytischer Abbau nicht stattfindet. Von Escherichia coli kann diese jedoch an Stelle von Glucose als Energiequelle verwertet werden (RAJEN u.a.). Die Verhältnisse bei der Ausscheidung und Rückresorption sollen denen bei der 2-Desoxyglucose gleichen.

Formel:



✳ markiertes C-Atom

3.3. Methode der Flüssigkeitszintillationszählung

3.3.1 Aufbereitung der Blutproben (KUNZ)

Anfänglich wurde 1 ml Blut mit o,1 ml einer 60%-igen Perchlorsäure zur Enteiweißung gemischt. Da die dabei gemessenen Aktivitäten jedoch außerordentlich hoch waren, nahm man später zur besseren Handhabung und aus methodischen Gründen eine stärkere Verdünnung aller Proben vor.

Sofort nach Entnahme aus dem Herzkatheter wurde 1 ml Blut zur Enteiweißung und Unterbrechung des Blutzellstoffwechsels mit 1 ml einer 6%-igen Perchlorsäure gemischt, anschließend in Kälte zentrifugiert und der Überstand dekantiert. Zur weiteren Entfernung der Perchlorsäure neutralisierte man jedes Probegläschen mit 2 ml einer 2n-KOH und bewahrte es zur vollständigen Fällung der Perchlorsäure im Kühlschrank bei 0^{o} ca. eine Stunde auf. Danach wurde erneut zentrifugiert und der Überstand der einzelnen Proben in

einen Meßzylinder umgegossen und mit destilliertem Wasser auf 1o ml aufgefüllt. Nach Mischen pipettierte man 2 ml jeder Probe zur Szintillationsmessung in Kunststoffgläschen der Firma Vetter, Heidelberg und vermischte diese mit 1o ml der Szintillationsflüssigkeit.

3.3.2. Zusammensetzung der Dioxanszintillationsflüssigkeit nach BRAY

4 g PPO (2,5-Diphenyloxazol)
o,2 g POPOP (1,4-Di[2-(5-phenyloxazolyl)]benzol)
6O g Naphthalin
1oo ml absoluter Methylalkohol
2o ml Äthylenglykol

} und Dioxan auf 1000 ml

3.3.3. Flüssigkeitszintillationszählung

Die Aktivität der Proben wurde in dem Flüssigkeitszintillationszähler MARK I der Firma Nuclear, Chicago gemessen. Kanal A war nach der BALANCE-POINT-METHODE für T, Kanal B für ^{14}C und Kanal C für ^{131}Ba optimiert.

Meßeinstellung nach der Balance-Point-Methode:

	Attenuatoreinstellung (Verdünnungseinstellung)	Level (Fensterbreite)
T - Kanal A =	B : 8,50	0,5 - 9,9
^{14}C - Kanal B =	E : 4,00	0,5 - 9,9
^{131}Ba - Kanal C =	E : 8,00	0,5 - 9,9

3.3.4. Quenchkorrektur

Sie wurde unter Verwendung des externen ^{131}Ba-Standards mit der KANALVERHÄLTNISMETHODE durchgeführt. Zur Bestimmung der

Effektivität der Meßproben wurde mit einem ^{14}C-Standard unter Verwendung von o,9%-iger NaCl-Lösung eine Quenchkorrekturkurve aufgenommen. (Abb.1). Die Ausbeute der Proben in Prozent wurde nach dem C/A-Quotienten unter Anwendung der ^{131}-Ba-Messung von der Kurve abgelesen. Sie betrug im Mittel 4o%.

3.3.5. Berechnung der Gesamtaktivität im Blut

Die in der Zeiteinheit (1 min.) und einem bestimmten Volumen (2 ml) gemessene Gesamtaktivität im Blut in DPM errechnet sich nach folgender Formel:

$$DPM = \frac{CPM \times 1oo \times \text{Gesamtvolumen in ml}}{2\ ml \times \text{Ausbeute in \%}}$$

DPM = disintegration per minute (Gesamtaktivität pro min.)
1 DPM = o,o167 DPS = o,45 pCi oder
1 pCi = o,o37 DPS = 2,22 DPM
CPM = count per minute oder IPM (Impulszahl pro min.)
Ausbeute = aus der Quenchkorrekturkurve abgelesener %-wert für den jeweiligen C/A-Quotienten

Berechnungsbeispiel:

Gesamtaktivität im Blut in DPM für Tier 1 nach intravenöser Applikation von 1 µCi/kg Gewicht markierter 3-Oxy-Methylglucose.

CPM = 564,5/2 ml; Gesamtvolumen = 1o ml; Ausbeute = 38 %.

$$DPM = \frac{564,5 \times 1oo \times 1o\ ml}{2\ ml \times 38} = 7428$$

3.4. Statistische Auswertung

Aus den DPM-Werten zu den einzelnen Abnahmezeiten wurde getrennt für die Tiergruppe mit intravenöser und nasaler Applikation und getrennt für Glucose, 2-Desoxyglucose und 3-Oxy-Methylglucose der arithmetische Mittelwert $\bar{x}$ (1), der mittlere Fehler des Einzelwertes oder die sogenannte Standardabweichung s_x (2) und der mittlere Fehler des Mittelwertes $s_{\bar{x}}$ (3) nach folgenden Formeln berechnet:

(1) $$\bar{x} = \frac{\sum x_i}{N}$$

x_i = ein beliebiger Meßwert
N = Anzahl der Tiere

(2) $$s_x = \sqrt{\frac{\sum (x_i - \bar{x})^2}{N - 1}}$$

$\sum (x_i - \bar{x})^2$ = SAQ (Summe der Abweichungsquadrate)
$N - 1$ = Freiheitsgrade

(3) $$s_{\bar{x}} = \frac{s_x}{\sqrt{N}}$$

Im Bereich $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ liegt mit einer Wahrscheinlichkeit von 68% der unbekannte wahre Mittelwert der Grundgesamtheit, aus der die Stichprobe entnommen wurde.

Mit Hilfe der Varianzanalyse wurde für die ersten beiden Versuchsreihen (Glucose und 2-Desoxyglucose) geprüft, ob zwischen den Mittelwerten der Applikationsgruppen und den Mittelwerten der Zeitgruppen statistisch signifikante Unterschiede bestehen. Als varianzanalytisches Modell wurde die Zweiwegeklassifikation mit Mehrfachbesetzung (balanzierter Fall) angewendet (WEBER).

Die Prüfung der Mittelwertsdifferenz erfolgte mit dem so-

genannten Tuckey-Test. Als vorgegebene Irrtumswahrscheinlichkeit wurde für alle statistischen Prüfungen $2P < 0{,}01$ gewählt (DIEM und LEITNER).

3.5. Anhang: Versuche an menschlichen überlebenden Schleimhautstücken

Je 6 Gewebestückchen von normaler und 7 von atrophisch-hyperplastischer Nasenschleimhaut wurden sofort nach Entnahme im etwa 1oo-fachen Volumen physiologischer NaCl-Lösung bei $4^{o}C$ im Kühlschrank 2 - 3 Stunden aufbewahrt. Dadurch konnten eventuell enthaltene Narkosestoffe ausdiffundieren. Im Anschluß daran wurde die Schleimhautoberfläche jedes Gewebestückchens auf ein Glucose-Inkubationsmedium gebracht. Darin waren 11 µMol D(+)Glucose/ml in o,9%-iger NaCl-Lösung enthalten. Die Temperatur wurde konstant gehalten und das Medium mit einem Magnetrührer ausreichend durchmischt.

Gemessen wurde die Glucosekonzentration im Medium in µMol/ml mit der HEXOKINASEMETHODE. Die Aufnahme der Glucosekonzentration abhängig von der Inkubationszeit wurde auf die Schleimhautoberfläche bezogen.

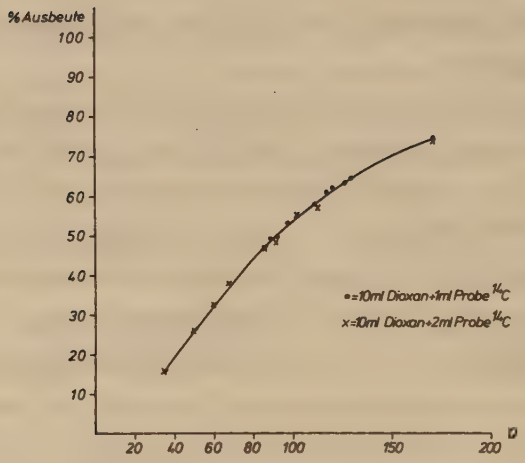


Abbildung 1: Quenchkorrekturkurve

Ordinate: Ausbeute in %

Abszisse: $Q = \frac{\text{Kanal A}}{\text{Kanal C}}$

Attenuatoreinstellung			Level
Kanal A = B	:	8,5o	o,5 - 9,9
Kanal B = E	:	4,oo	o,5 - 9,9
Kanal C = E	:	8,oo	o,5 - 9,9

4.ERGEBNISSE

4.1. Blutkonzentrationsmessungen nach intravenöser und nasaler Applikation von markierter Glucose, 2-Desoxy-glucose und 3-Oxy-Methylglucose

4.1.1. Uniform markierte ^{14}C-D-Glucose

Die Messungen wurden an 2 Tiergruppen zu je 3 Tieren durchgeführt (n = 3). Nach intravenöser Applikation zeigt sich ein sehr schneller Anstieg der ^{14}C-Aktivität auf 7900 DPM nach 3 Minuten (erste Meßzeit). Danach erfolgt ein zunächst rascher, dann langsamer Abfall bis auf 4100 DPM nach 36 Minuten (letzte Meßzeit). Der Kurvenverlauf der ^{14}C-Aktivität nach nasaler Aufträufelung ist dagegen im ansteigenden Teil flacher und erreicht sein Maximum bei 2035 DPM erst nach 18 Minuten, um dann nach 36 Minuten auf 1100 DPM wieder langsam abzusinken. (Tab. 1; Abb. 2).

Die statistische Auswertung der Ergebnisse mit Hilfe der Varianzanalyse sagt folgendes aus: Obwohl nur 3 Tiere je Applikationsform eingesetzt wurden, läßt sich die unterschiedlich hohe Konzentration nach intravenöser und nasaler Applikation zu allen Meßzeiten statistisch sichern. Mit Ausnahme der ersten beiden Zeitwerte (3' und 9') verlaufen beide Kurven annähernd parallel, es besteht also keine Wechselwirkung. Die Mittelwertsdifferenzen (Tuckey-Test) zwischen den Zeitgruppen, d.h. die Konzentrationsveränderung über die Zeit sind relativ zur großen Streuung (siehe $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ - Bereich) klein und statistisch nicht zu sichern.

Tier \ Zeit	3'	9'	18'	27'	30'	36'
i.v. 1	8236	7155	6791	6064	5902	5538
2	7746	5418	3974	3359	2923	2600
3	7711	5553	5601	4873	4457	4175
$\bar{x}$	7898	6042	5455	4765	4427	4104
s_x	294	966	1414	1356	1490	1470
$s_{\bar{x}}$	170	559	817	784	861	850
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	8068	6601	6272	5549	5288	4954
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	7728	5483	4638	3981	3566	3254
nasal 4	1759	2024	2296	2140	2131	1506
5	25	833	1536	1409	1375	896
6	1186	2246	2274	1449	969	935
$\bar{x}$	990	1701	2035	1666	1492	1112
s_x	884	760	433	411	590	342
$s_{\bar{x}}$	511	439	250	238	341	197
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	1501	2140	2285	1904	1833	1309
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	479	1262	1785	1428	1151	915

Tabelle 1: DPM-Werte nach intravenöser und nasaler Applikation von U-^{14}C-D-Glucose
Von den DPM-Werten ist jeweils der Leerwert abgezogen.

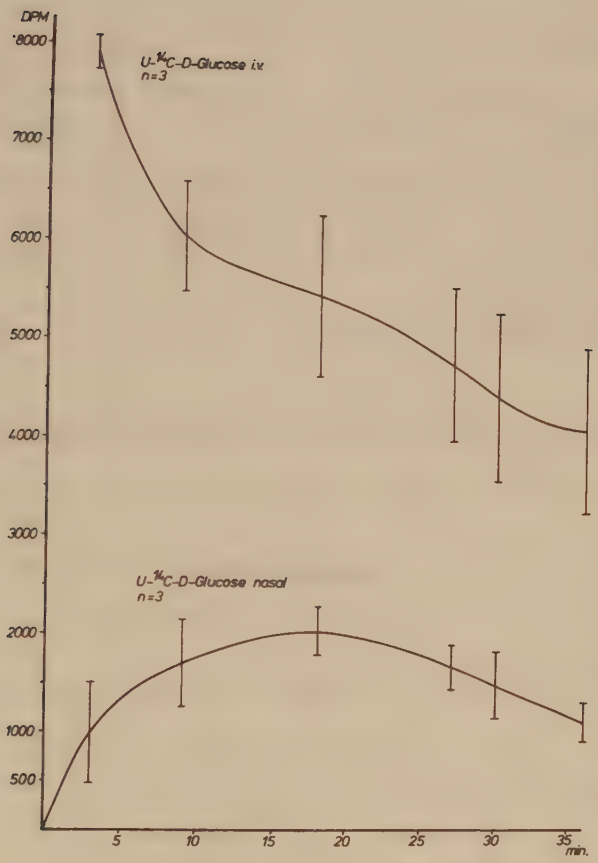


Abbildung 2: ^{14}C-Aktivität im Blut nach Applikation von U-^{14}C-D-Glucose intravenös und nasal
Ordinate: ^{14}C-Gesamtaktivität im Blut in DPM
Abszisse: Zeit in Minuten

Tafel der Varianzanalyse

Variabilitäts-ursache	SAQ	FG	MQ
Applikations-formen (Appl.)	14o371154,7	1	14o371154,7
Zeitgruppen (Zeit)	13518178	5	27o3635
Wechselwir-kung (WW)	14o659o4	5	281318o
innerhalb d. Un-tersuchgs.-Gruppen (Rest)	26545461	24	11o6o6o
Insgesamt	1945oo698,7	35	----

Prüfquotienten

$$\frac{MQ_{Appl.}}{MQ_{Rest}} = F_{Appl.} = 126,9 \quad F_{Tafel\ (o,99;1;24)} = 7,82$$

$$\frac{MQ_{Zeiten}}{MQ_{Rest}} = F_{Zeit} = 2,44 \quad F_{Tafel\ (o,99;5;24)} = 3,9o$$

$$\frac{MQ_{WW}}{MQ_{Rest}} = F_{WW} = 2,54 \quad F_{Tafel\ (o,99;5;24)} = 3,9o$$

F_{Zeit} und F_{WW} nicht signifikant $(p > o,o1)$

$F_{Appl.}$ signifikant

4.1.2. C-1-markierte 2-Desoxyglucose

Hierbei wurden die Untersuchungen an 2 Tiergruppen zu je 5 Tieren vorgenommen (n = 5). Auch hier verläuft die ^{14}C-Aktivitätskurve nach intravenöser Injektion bis zum ersten Meßwert steil, erreicht aber nur 46oo DPM als Höchstwert und fällt zuerst schneller, danach wieder langsamer auf 18oo DPM nach 36 Minuten ab. Bei nasaler Verabreichung zeigt sich ein flacher Kurvenverlauf mit einem Höchstwert von nur 1o5o DPM bei 25 Minuten. Der letzte Meßwert (36') beträgt noch 95o DPM. (Tab. 2; Abb. 3).

Die Varianzanalyse ergab einen statistisch signifikanten Unterschied zwischen den Applikationsgruppen i.v. und nasal, wenn man jeweils das Mittel über die Zeitgruppen nimmt. Ebenfalls bestehen statistisch signifikante Unterschiede zwischen mehreren Zeitgruppen für den Fall, daß man das Mittel über die beiden Applikationsgruppen zur Prüfung einsetzt. Die statistisch signifikante Wechselwirkung zwischen Applikations- und Zeitgruppen macht die Prüfung von Untergruppen-Mittelwertsdifferenzen (Tuckey-Test) notwendig. (Tab. 3)

4.1.3. CH_3-markierte 3-Oxy-Methyl-D-Glucose

Mit dieser Verbindung wurden Versuche mit 2 Tiergruppen zu je 3 Tieren durchgeführt (n = 3). Sie ist jedoch im Gegensatz zur Glucose und 2-Desoxyglucose nicht in destilliertem Wasser, sondern in 75%-igem Äthylalkohol gelöst, wodurch die Ergebnisse anders beeinflußt werden. Nach intravenöser Verabreichung liegt der Maximalwert der ^{14}C-Gesamtaktivität im Blut nach 3 Minuten bei 755o DPM. Zu Beginn ist die Kurve

wieder sehr steil, fällt dann rasch und nur im letzten Teil etwas langsamer auf 3800 DPM nach 36 Minuten ab. Die ^{14}C-Aktivität nach nasaler Applikation zeigt gegenüber Glucose und 2-Desoxyglucose einen völlig anderen Verlauf. Sie steigt schnell und gleichmäßig an und erreicht ihren Höchstwert bei 3500 DPM erst nach 36 Minuten. (Tab. 3; Abb. 4).

4.2. Anhang: Glucosekonzentrationsmessungen an menschlichen überlebenden Schleimhautstücken

Es wurde die Glucoseaufnahme von Schleimhautstücken normaler und pathologisch veränderter menschlicher Nasenschleimhaut untersucht. Dabei ergab sich für die normale Schleimhaut eine raschere Aufnahme als für die atrophisch-hyperplastische. (Abb.5).

Tier \ Zeit	3'	9'	18'	27'	30'	36'
iv						
1	6176	2357	2876	2124	1766	1625
2	4284	3478	2604	2343	1826	1814
3	4951	4047	2735	3046	2344	2051
4	2984	2779	2093	1982	1719	1240
5	4582	3135	2238	2090	2003	2123
$\bar{x}$	4595	3159	2509	2317	1932	1771
s_x	1153	648	332	428	254	356
$s_{\bar{x}}$	524	294	151	195	116	162
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	5119	3453	2660	2512	2048	1933
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	4071	2865	2358	2122	1816	1609
nasal						
6	177	1384	1671	1618	1224	1567
7	353	892	1002	1267	1189	1205
8	244	614	1057	842	952	911
9	107	412	722	740	781	455
10	206	427	517	759	685	600
$\bar{x}$	217	746	994	1045	961	946
s_x	91	406	437	385	240	454
$s_{\bar{x}}$	41	185	199	175	109	206
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	258	931	1193	1220	1070	1152
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	176	561	795	870	852	740

Tabelle 2: DPM-Werte nach intravenöser und nasaler Applikation von C-1-markierter 2-Desoxy-D-Glucose Von den DPM-Werten ist jeweils der Leerwert abgezogen.

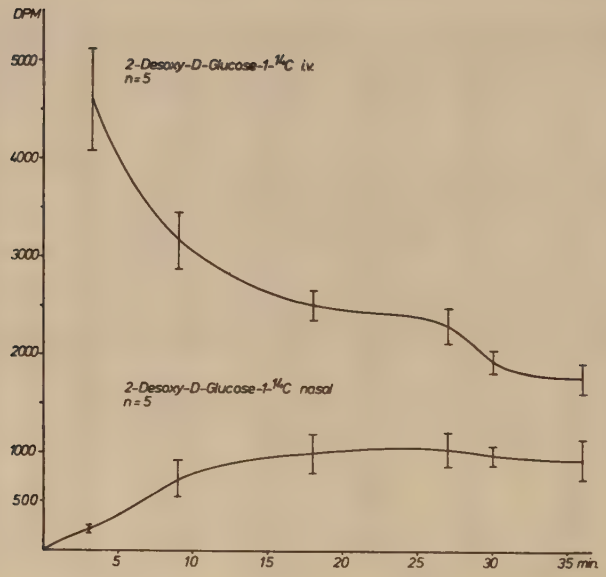


Abbildung 3: ^{14}C-Aktivität im Blut nach Applikation von C-1-markierter 2-Desoxy-D-Glucose intravenös und nasal

Ordinate: ^{14}C-Gesamtaktivität im Blut in DPM

Abszisse: Zeit in Minuten

Tier \ Zeit	3'	9'	18'	27'	30'	36'
i.v. 1	8163	7234	5725	4681	5070	4448
2	8002	5608	5061	4473	4428	3901
3	6504	5657	4063	3603	3205	3023
$\bar{x}$	7556	6166	4950	4252	4234	3791
s_x	915	925	837	572	948	719
$s_{\bar{x}}$	529	535	484	331	548	416
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	8085	6701	5434	4583	4782	4207
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	7027	5631	4466	3921	3686	3375
nasal 4	2216	3696	3652	4985	5797	6007
5	687	1503	1823	2330	2337	2369
6	908	1422	1612	1921	2200	2121
$\bar{x}$	1270	2207	2362	3079	3445	3499
s_x	826	1290	1122	1664	2038	2176
$s_{\bar{x}}$	478	746	649	962	1178	1258
$\bar{x}+s_{\bar{x}}$	1748	2953	3011	4041	4623	4757
$\bar{x}-s_{\bar{x}}$	792	1461	1713	2117	2267	2241

Tabelle 3: DPM-Werte nach intravenöser und nasaler Applikation von 3-Oxy-Methyl-^{14}C-D-Glucose
Von den DPM-Werten ist jeweils der Leerwert abgezogen.

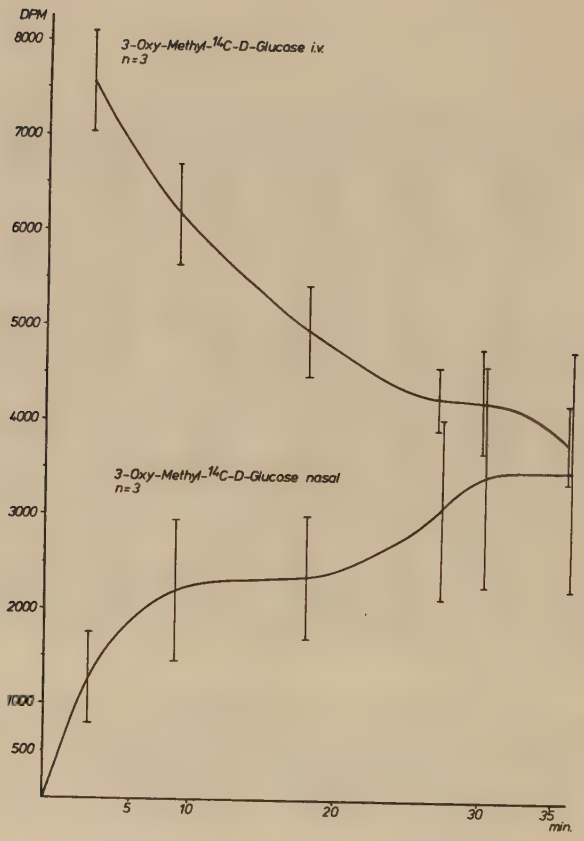


Abbildung 4: ^{14}C-Aktivität im Blut nach Applikation von 3-Oxy-Methyl-^{14}C-D-Glucose intravenös und nasal
Ordinate: ^{14}C-Gesamtaktivität im Blut in DPM
Abszisse: Zeit in Minuten

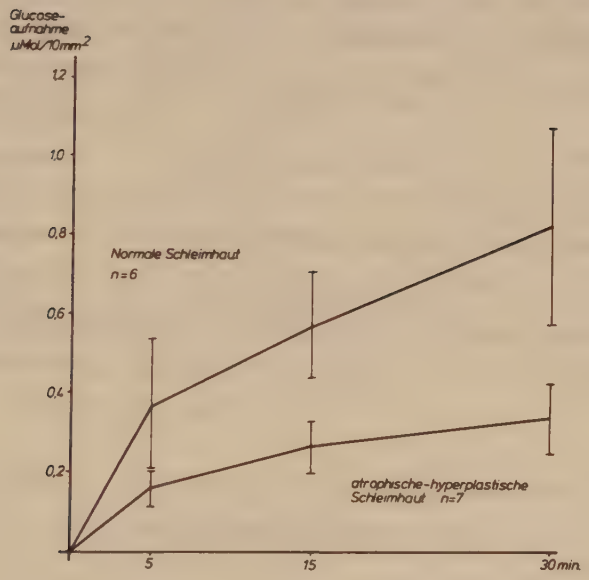


Abbildung 5: Glucoseaufnahme in überlebender Nasenschleimhaut (11 µMol/ml D(+)-Glucose in o,9%-iger NaCl-Lösung)

Ordinate: Glucoseaufnahme in µMol/1o mm^2

Abszisse: Zeit in Minuten

Tafel der Varianzanalyse

Variabilitäts-ursache	SAQ	FG	MQ
Applikations-formen (Appl.)	122597129,2o	1	122597129,2o
Zeitgruppen (Zeit)	4o6377o7,89	6	6772951,31
Wechselwir-kung (WW)	81581218,4o	6	13596869,73
innerhalb d. Un-tersuchgs.-Gruppen (Rest)	23931536,67	56	427348,86
Insgesamt	268747592,16	69	----

Prüfquotienten

$$\frac{MQ_{Appl.}}{MQ_{Rest}} = F_{Appl.} = 286,87 > F_{Tafel\ (o,99;1;56)} = 7,11$$

$$\frac{MQ_{Zeiten}}{MQ_{Rest}} = F_{Zeit} = 15,84 > F_{Tafel\ (o,99;6;56)} = 3,15$$

$$\frac{MQ_{WW}}{MQ_{Rest}} = F_{WW} = 31,81 > F_{Tafel\ (o,99;6;56)} = 3,15$$

6. BESPRECHUNG DER ERGEBNISSE

In der angeführten Serie von Tierversuchen wurden unterschiedlich radioaktiv markierte Glucoseverbindungen auf die Nasenschleimhaut gebracht. Anschließend wurde die Radioaktivität im Blut (rechter Herzvorhof) in verschiedenen Zeitabständen gemessen. Als Substanzen wurden im einzelnen verwendet:

1. Uniform markierte ^{14}C-D-Glucose, von der erwartet werden kann, daß sie einem hohen Stoffwechsel in den zu durchwanderten Geweben und im Blut unterliegt. Ein Teil der ^{14}C-Aktivität findet sich als Metabolit im Blut oder als CO_2 in der Ausatmungsluft oder als Stoffwechselprodukt außerhalb der Blutbahn im Organismus.

2. C_1-markierte 2-Desoxy-D-Glucose, die im Säugerorganismus höchstens einem geringen Stoffwechsel unterliegt. Sie diente als Modell für den Übertritt einer zu resorbierenden Substanz von der Nasenschleimhautoberfläche ohne Veränderung durch Metabolisierungsvorgänge.

3. CH_3-markierte 3-Oxy-Methyl-D-Glucose in hochprozentiger alkoholischer Lösung. Auch bei dieser Verbindung kann eine Metabolisierung im menschlichen Organismus nach den bisherigen Erkenntnissen nicht erwartet werden. Das Verhalten müßte demnach dem der 2-Desoxy-D-Glucose entsprechen. Da als Lösungsmittel hochprozentiger Alkohol gewählt wurde, ist hier der Einfluß des Lösungsmittels in Bezug auf die Resorption und Verteilung von Bedeutung.

Zusätzliche Untersuchungen an isolierter menschlicher Nasenschleimhaut in vitro sollten ergänzend dazu weitere Aufschlüsse über die Aufnahmefähigkeit von Glucose ergeben.

Beim Vergleich der Blutkonzentrationen zwischen normaler markierter Glucose und nicht metabolisierbarer 2-Desoxy-Glucose zeigt sich ein schnellerer Anstieg der Blutaktivität nach nasaler Applikation von Glucose als nach 2-Desoxy-Glucosegabe. Nach intravenöser Verabreichung beider Substanzen liegen die Werte für D-Glucose deutlich über denen für 2-Desoxy-Glucose. Dieses Ergebnis muß als Stoffwechseleffekt an der applizierten Glucose gedeutet werden. Die höhere Aktivität stellt die Summe der im Blut gelösten Metabolite dar. (Abb. 6).

Es zeigt sich also, daß die Untersuchung der Resorptionsleistung der Nasenschleimhaut auf Schwierigkeiten stößt, wenn metabolisierbare Substanzen verwendet werden. Nach Angaben der Literatur (BREUNINGER u.a.) gilt gleiches auch für dissoziierbare, lipoidlösliche Stoffe, die eine anderweitige Änderung ihrer Struktur, zum Beispiel im Nasenschleim erfahren. Das gut wasserlösliche, nicht dissoziierte, weitgehend inerte Molekül der 2-Desoxy-Glucose kann als Modell zur Bestimmung der effektiven Resorption durch die Nasenschleimhaut angesehen werden. Verglichen mit der intravenösen Gabe der gleichen Menge erfolgt insgesamt die nasale Aufnahme in geringerem Umfange und langsamer. Die Verteilung im Organismus scheint gleicherweise nach intravenöser und nasaler Applikation nach 15 - 20 Minuten ihren End-

stand erreicht zu haben.

Die Resorption von nicht abbaubarer 3-Oxy-Methyl-Glucose aus der alkoholischen Lösung scheint demgegenüber rascher nach einem anderen Verteilungsprinzip vor sich zu gehen, wobei die Abschätzung des Lösungsmitteleffektes schwierig ist. Eine Schädigung der Nasenschleimhaut durch den Alkohol muß dabei als gesichert angesehen werden (PROETZ, BREUNINGER).

Die Befunde zeigen, daß die früheren Exhalationsversuche bezüglich der Aufnahme von normaler Glucose durch die Nasenschleimhaut nur vergleichend bewertet werden können. Bei den in vitro Versuchen an überlebender menschlicher Nasenschleimhaut ließ sich aber zeigen, daß wie in den Exhalationsversuchen die Resorption an der pathologisch veränderten Schleimhaut deutlich geringer als an der normalen Schleimhaut ist. Diese Ergebnisse unterstreichen die Bedeutung der Exhalationsversuche nach Glucosegabe, wobei entsprechende unterschiedliche Aufnahmegrößen an normaler und pathologisch veränderter Mucosa festgestellt werden konnten.

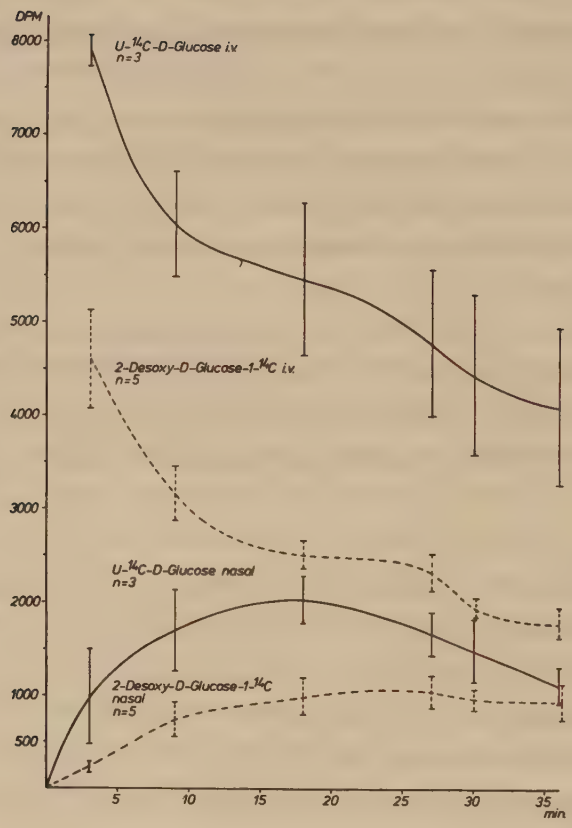


Abbildung 6: ^{14}C-Aktivität im Blut nach Applikation von U-^{14}C-D-Glucose und 2-Desoxy-D-Glucose-1-^{14}C intravenös und nasal

Ordinate: ^{14}C-Gesamtaktivität im Blut in DPM

Abszisse: Zeit in Minuten

6. LITERATURVERZEICHNIS

BARTELHEIMER, H., HYDE, W. und THORN, W.
D-Glucose und verwandte Verbindungen in Medizin und Biologie
Ferdinand Emke Verlag Stuttgart (1966)

BERL, H.-J.
Die Aufnahme markierter Glucose von Schleimhäuten in Nase, Mund und Ohr
Dissertation Tübingen 1967

BRAY, C.A.
Anal. Bioch. 1, 279 (1960)

BREUNINGER, H.
Über die Verweildauer von Salzlösungen, Ölen, Schleim und Emulsionen auf der Nasenschleimhaut
HNO (Berlin) 6, 235 (1957)

Der Einfluß der Löslichkeitsart von Arzneistoffen auf die Resorption durch die menschliche Nasenschleimhaut
Arch. Ohr-usw. Heilk. 172, 277 (1958)

Reflexe und Resorption bei arteficieller Entzündung an der Nasenschleimhaut der Ratte
Arch. Ohr-usw. Heilk. 172, 457 (1958)

Über die Diffusion von Stoffen verschiedener Größe und Löslichkeit im Nasenschleim
Arch. Ohr-usw. Heilk. 187, 662 (1965)

BREUNINGER, H. und FEINE, U.
Über die Aufnahme markierter Glucose von Schleimhäuten in Nase, Mund und Mittelohr
Arch. Ohr-usw. Heilk. 191, 662 (1968)

v. BUDDENBROCK, W.
Vergleichende Physiologie
Bd. III: Ernährung, Wasserhaushalt und Mineralhaushalt der Tiere
Verlag Birkhäuser Basel (1952)

BUSCH, K.
Über die verschiedenartige Aufnahme markierter Glucose von der Nasenschleimhaut im sauren und alkalischen Bereich
Dissertation Tübingen 1969

COHRS, P. JAFFE,R. und MEESSEN, H.
Pathologie der Laboratoriumstiere
Springer Verlag Berlin (1958)

DIEM, K. und LEITNER, C.
Wissenschaftliche Tabellen Geigy
J.R. Geigy AG, Pharma, Basel (1968)

DOST, F.H.
Grundlagen der Pharmakokinetik
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1968)

HANSEN, D. — Das Verhalten des Serumspiegels nach intratrachealer und intravenöser Applikation von Pantocain beim Meerschweinchen
Arch. Ohr-usw. Heilk. 191, 768 (1968)

Diskussion
Arch. Ohr-usw. Heilk. 194, 447 (1969)

HERRMANN, A. — Experimentelle Untersuchungen der Schleimhautfunktion der oberen Luftwege
Z. Laryng. 24, 479 (1933)

KARLSON, P. — Kurzes Lehrbuch der Biochemie für Biochemiker und Mediziner
Georg Thieme Verlag Stuttgart (197o)

KRAUSE, R. — Mikroskopische Anatomie der Wirbeltiere in Einzeldarstellung
Bd. I: Säugetiere (Kaninchen)
Verlag Walter de Gruyter Berlin (1921)

KUTZIM, H. — In: Hoffmann/Delaloye:
Radioisotope in der Gastroenterologie
F.K. Schattauer Verlag Stuttgart (1967)

LANDOIS, L. und ROSEMANN, H.-U. — Lehrbuch der Physiologie des Menschen
Urban & Schwarzenberg Verlag München-Berlin (196o)

LIVERIERO, E. und BELFORTE, G. — Komparative Anatomie der Nasenschleimhaut des Jacobson'schen Organs
Relaz. Soc. otorhinolaring. lat. 3, 28 (1964)

MIRA, E. — Histochemische Eigenschaften der Bowman'schen Drüsen beim Kaninchen
Boll. Mal. Orecch. 8o, 25o (1962)

NAUMANN, H.H. — Die Mikrozirkulation in der Nasenschleimhaut
Georg Thieme Verlag Stuttgart (1961)

NAUMANN, W.H. und MÜNZEL, M. — Resorptionsmessungen an der Nasenschleimhaut des Kaninchens
Arch. Ohr-usw. Heilk. 191, 665 (1968)

Zur Isotopentechnik bei Resorptionsversuchen an der Nasenschleimhaut
Arch. Ohr-usw. Heilk. 194, 443 (1969)

PROETZ, A.W. — Essays of the Applied Physiology of the Nose
Anals Publishing Company St. Louis USA (1941)

RAUEN, H. — Biochemisches Taschenbuch
Springer Verlag Berlin (1964)

TOGANOW, Y. J. oto-rhino-laryng. Soc. Jap. 63, 1882 (1960)

WEBER, E. Grundriß der Biologischen Statistik Gustav Fischer Verlag Stuttgart (1967)

WISKEMANN, A. Arch. klin. exp. Derm. 219, 458 (1964)

Herrn Professor Dr. H.Breuninger danke ich für die Überlassung des Themas und die freundliche Unterstützung bei der Durchführung der Versuche.

L E B E N S L A U F

Am 15.2.1938 wurde ich, Werner de Marées, als Sohn des Doktors der Veterinärmedizin Walter de Marées und seiner Ehefrau Anna de Marées, geb. Naumann in Chemnitz/Sachsen geboren. 1956 bestand ich die Reifeprüfung an der Oberschule in Glauchau/Sachsen.

Im Sommersemester 1958 begann ich an der Philipps-Universität Marburg das Medizinstudium und legte dort 1961 die ärztliche Vorprüfung ab. Anschließend studierte ich drei Semester an der Eberhard-Karls-Universität Tübingen. Das Staatsexamen der Medizin bestand ich 1965 an der Medizinischen Fakultät der Universität Marburg.

Nach der Medizinalassistentenzeit erhielt ich 1967 die Approbation.